

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz
Direktor Prof. Dr. med. H. Franke

**VERGLEICHENDE BIOCHEMISCHE UND HISTOLOGISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON ACTIHAEMYL AUF
DIE ERHOLUNGSFÄHIGKEIT DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN
SCHOCKLEBER DER RATTE**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

WALTER KLEIN
aus Papenburg

vorgelegt
von
und

CLAUDIA KLEIN, geb. Classe
aus Berlin

1978

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz
Direktor Prof. Dr. med. H. Franke

VERGLEICHENDE BIOCHEMISCHE UND HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUM EINFLUß VON ACTIHAEMYL AUF DIE ERHOLUNGSFÄHIGKEIT
DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN SCHOCKLEBER DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt

von

Walter Klein
aus Papenburg

und

Claudia Klein, geb. Classe
aus Berlin

Referent : Prof. Dr. med. Bernhard Hölscher
Korreferent : Prof. Dr. med. D. Neubert



Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 19.5.78

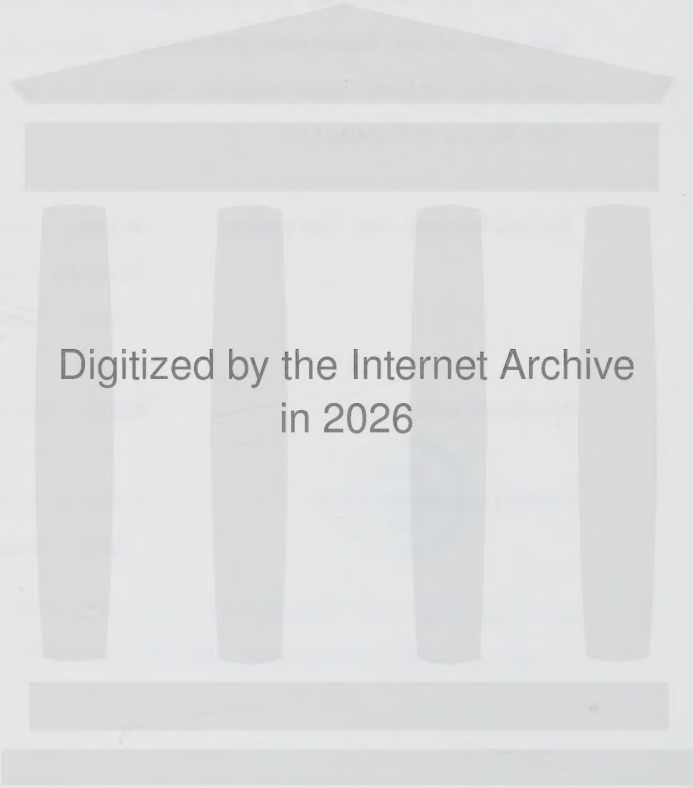
Vorwort bei einer Gemeinschaftsarbeit

Da die gegenwärtige Promotionsordnung fordert, daß aus einer Gemeinschaftsarbeit Einzelleistungen ersichtlich sein müssen, haben wir die Arbeit wie folgt aufgeteilt:

Durchführung der Versuche:	Walter Klein
	Claudia Klein,
	geb. Classe

Biochemischer Teil:	Walter Klein
---------------------	--------------

Histologischer Teil:	Claudia Klein,
	geb. Classe



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Einleitung

Im hämorrhagischen Schock kommt es zu einer mangelhaften Gewebsdurchblutung mit Unterschreitung des Bedarfs der Zellen an Sauerstoff. Diese Minderversorgung führt sekundär zu funktionellen und morphologischen Veränderungen (2,10,35,42,53, 57,59). Ein wesentliches Merkmal der funktionellen Störung ist die metabolische Azidose (19,26,32,59,64). Schon in der Frühphase des Schocks wurden fleckförmige anoxische Herde in der Leber gefunden (31). Die Leber nimmt wegen ihrer zahlreichen Stoffwechselfunktionen eine zentrale Stellung im Schock ein (35,42).

Es wäre von großem therapeutischen Nutzen, die Auswirkungen des Schocks auf die Leber pharmakologisch zu beeinflussen und auf diese Weise Schäden zu verhüten bzw. ihre Regeneration zu unterstützen. Einem eiweißfreien Hämoderivat aus dem Blut junger Kälber (Extr. sang. deprot. sicc. Actihaemyl[®] ⁺⁾) wird ein positiver Einfluß auf die Hypoxieresistenz zugeschrieben. Jaeger und Mitarbeiter zeigten in Versuchen mit dem Warburgschen Apparat an Leberhomogenaten mit Actihaemyl eine Steigerung der Zellatmung bis zu 200 % (30). Ebenso steigt die Sauerstoffaufnahme durch Rattenlebermitochondrien bei Zusatz von Actihaemyl (45,51). Breuer et al. (5) und Goslar et al. (18) konnten eine beschleunigte Regeneration von Enzymaktivitäten bei Gabe von Actihaemyl nach Schädigung durch Hypoxie und Vergiftung nachweisen.

+) Seit 1. 1. 1977 Handelsname in Actovegin[®] geändert.

In der vorliegenden Untersuchung sollte am Versuchsmodell der isolierten Leberperfusion die Wirkung von Actihaemyl auf die Erholungsfähigkeit der Leber nach einem hämorrhagischen Schock von 60 min Dauer unter Zuhilfenahme biochemischer und morphologischer Kriterien geprüft werden. Mit der Methodik der isolierten Leberperfusion ist es möglich, extrahepatische Faktoren auszuschalten und so die zeitliche Reihenfolge der Reaktionsabläufe des intermediären Stoffwechsels und die durch Sauerstoff- und Substratmangel bedingten Zellveränderungen unter übersichtlichen experimentellen Bedingungen zu studieren.

Methodik

Tiermaterial: Männliche Albinoratten (Stamm Wistar, Hannover) mit einem Gewicht von 180-200 g hatten bis unmittelbar vor Versuchsbeginn Zutritt zu einem Standard-trockenfutter (Altromin[®], Altrogge, Lage/Lippe) und Wasser ad libitum.

Ausführung des Schocks: In oberflächlicher Äthernarkose und unter halbsterilen Bedingungen wurde die a. carotis freipräpariert und ein PVC-Katheter eingebunden. Zur Verhütung der Blutgerinnung wurde das Tier heparinisiert (5 mg/kg Liquemin/Roche). Das Versuchstier wurde innerhalb von 15 min in einen silikonisierten Schlauch von 180 cm Länge (innerer $\varnothing$ 3 mm) bis zu einem arteriellen Mitteldruck von 40 mm Hg entblutet. Während der Schockphase auftretende

Druckschwankungen konnten durch Heben und Senken des Schlauches ausgeglichen werden. Die Entblutungsmenge betrug $6,2 \pm 1,4$ ml. Vor dem Entbluten und am Ende der hypotensiven Phase von 60 min wurden 3 Tropfen arterielles Blut zur Bestimmung von Hämoglobin (Bestimmung als Zyanohämoglobin, Photometer Eppendorf), Hämatokrit (Mikrohämatokrit-Zentrifuge Ecco x 1000) und pH - Wert (Mikromethode nach Siggard-Andersen (58)) entnommen.

Perfusionsmedium: Das Perfusat wurde nach Hems et al. modifiziert und betrug 150 ml:

100 ml Krebs-Henseleit-Lösung

50 ml Rindererythrozytensuspension

23,3 g/l Rinderalbumin reinst (Behring-Werke, Marburg)

20 mg Reverin [®] (Hoechst, Frankfurt/Main)

3 ml Actihaemyl (Hormonchemie, München) bzw.

3 ml NaCl 3,51 % (gleiche Osmolarität wie Actihaemyl) als Placebo

0,3 ml Liquemin (Roche).

Das Hämoglobin betrug $9,7 \pm 1,0$ g %, der Hämatokrit 26 ± 5 Vol %.

Die Rindererythrozyten wurden dreimal mit 0,9 % NaCl - Lösung gewaschen und bis zur Verwendung nicht länger als 48 Std. bei 4° C in einem sterilisierten Glasgefäß mit Einschliffstopfen unter Zusatz von 40 mg Reverin aufbewahrt. Vor Versuchsbeginn wurde das Perfusat mit einem 95 % O_2 + 5 % CO_2 - Gasgemisch äquilibriert. Der pH-Wert betrug $7,34 \pm 0,04$.

Perfusionsapparatur: Die Perfusionsapparatur befindet sich in einem Gehäuse aus Kunststoff, dessen durchschnittliche Temperatur durch ein kontaktthermometergesteuertes Thermo-lüfter-Kühlsystem bei 37°C gehalten wurde. Durch eine Rollerpumpe wird das Perfusionsmedium aus einem Vorratsgefäß zum oberen Ende eines Kugeloxygenators aus Glas befördert. Nach dem Gegenstromprinzip wird das herabfließende Perfusat von einem wasserdampfgesättigten $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$ - Gasgemisch begast. Der hydrostatische Perfusionsdruck wird durch einen Überlauf, der sich am unteren Ende des Oxygenators befindet, bei $12\text{ cm H}_2\text{O}$ konstant gehalten. 2 O_2 -Makroelektroden (Beckmanns Instruments, Palo Alto, Calif., USA), die in Durchflußküvetten angebracht sind, messen den O_2 -Druck im zu- und abfließenden Perfusat. In der Wandung des Kugeloxygenators und der Durchflußküvetten zirkuliert Wasser, dessen Temperatur über einen thermostatisch geregelten Tauchsieder bzw. Tauchkühler konstant gehalten wird. Die durchschnittliche Temperatur des zufließenden Perfusionsmediums betrug 37°C . Vor Versuchsbeginn wurden der Oxygenator, das Vorratsgefäß, die Durchflußküvetten und die Silikonschläuche (innen $\varnothing 4\text{ mm}$, außen $\varnothing 6\text{ mm}$) sterilisiert.

Isolierung der Leber in situ : Am Ende der Schockphase wurde die Bauchhöhle durch Medianschnitt eröffnet. Über den Carotiskatheter wurde nochmals Heparin ($0,5\text{ ml}$ Liquemin, Roche) verabreicht. Der Gallengang wurde dicht vor der Einmündung in das Duodenum durchtrennt. Die Hohlvene dicht oberhalb der Nierenvenen sowie die Leberarterien wurden freipräpariert und angeschlungen. Die Pfortader wurde freigelegt

und ein PVC-Katheter (inn. $\varnothing$ 1,5 mm, außen $\varnothing$ 2 mm) eingebunden. Anschließend wurde die Brusthöhle eröffnet. Vom rechten Vorhof aus wurde über die v. cava sup. ein gleichkalibrierter PVC-Katheter bis zum Zwerchfell vorgeschoben und durch eine Ligatur gesichert. Die angeschlungene v. cava inf. sowie die Leberarterien wurden unterbunden und die Katheter an die Perfusionsapparatur angeschlossen. Über die Leber wurde eine Plastikfolie gelegt, um eine Austrocknung zu vermeiden. Aus dem gleichen Grunde wurde während der Perfusion die Leber wiederholt mit 0,9 %iger NaCl benetzt. Die Operationszeit betrug im Durchschnitt 10 min, die Phase der warmen Ischämie von der Thorakotomie bis zum Perfusionsbeginn dauerte nicht länger als 3 min.

Versuchsanordnung: In 6 Versuchsgruppen (Tab. 1) wurden die Lebern unmittelbar nach dem 60 minütigen Schock in situ isoliert und verschieden lang perfundiert. In einer weiteren Versuchsgruppe (Serie O) wurden die Lebern nach einer gleich langen Schockdauer ohne Perfusion für die histologische und chemische Aufarbeitung entnommen. Ratten einer Kontrollserie (Serie K) dienten zur Bestimmung der Normwerte.

Tab. 1

Versuchsgruppe (n=6)	Perfusionsdauer	Behandlung
A	30 min	Placebo
B	30 min	Actihaemyl
C	60 min	Placebo
D	60 min	Actihaemyl
E	120 min	Placebo
F	120 min	Actihaemyl

Im Verlauf der Perfusion wurden nach 5, 30, 60 und 120 min der pH-Wert bestimmt und der Flow direkt mit einem Meßzylinder gemessen. Die arteriellen und venösen Sauerstoffdrucke wurden fortlaufend registriert (Rikadenki, Mehrkanalschreiber, Tokio). Der O_2 -Verbrauch wurde errechnet nach der Formel:

$$[Hb \cdot (\text{art. } S_{O_2} \% - \text{ven. } S_{O_2} \%) + \frac{\% \cdot \Delta pO_2}{\text{atm. p}}] \frac{\text{Flow}}{\text{Lebergew.}} \quad (\text{ml } O_2 \cdot g^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$$

Wenn während der Perfusion der pH-Wert unter 7,2 absank, wurde dem Perfusat THAM-Puffer in einer Verdünnung mit 0,9 %igem NaCl im Verhältnis 1:10 zur Einstellung auf physiologische Werte zugegeben. In Abständen von 30 min wurde dem Perfusionsmedium 0,1 ml Liquemin (Roche) zugesetzt.

In dem vor Beginn und am Ende der Perfusion entnommenen Gewebeproben wurde der Wassergehalt durch Gewebstrocknung bis zur Gewichtskonstanz ermittelt. Weitere Proben dienten zur histologischen Aufarbeitung. Das restliche noch perfundierte Lebergewebe wurde innerhalb von 2 Sekunden in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Biochemische Untersuchungsmethoden

Das eingefrorene Lebergewebe wurde gewogen und in eisgekühlter 6 % (w/v) $HClO_3$ (1 g Leber / 3,25 ml $HClO_3$) in einem Pistill-Homogenisator nach Potter homogenisiert. Für die Glykogenbestimmung wurde 1 ml Homogenat entnommen und in 3 ml 0,3 N KOH aufbewahrt. Das restliche Homogenat wurde

15 min lang in der Kühlzentrifuge (Sorvall Superspeed RC2-B, Newton, Connect., USA) bei 10 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 5 M K_2CO_3 -Lösung neutralisiert und nochmals zentrifugiert. In aliquoten Teilen des Überstandes wurden ATP, ADP und AMP nach Adam et al. (1), Laktat nach Hohorst (22), Pyruvat nach Czok und Lamprecht (11), β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat nach Williamson et al. (67) bestimmt. Die Glykogenbestimmung wurde nach der von Isselhard (28) modifizierten Methode für perchlorsaure Organextrakte durchgeführt.

Die biochemischen Meßgrößen wurden mittels zweifacher Varianzanalyse auf signifikante Unterschiede zwischen den Placebo- und Actihaemyl-Perfusionsserien ausgewertet. Von Interesse war, ob die untersuchten Parameter von Behandlung und Perfusionsdauer abhängen und ob eine Wechselbeziehung zwischen Perfusionsdauer und Behandlung vorhanden ist. Für den Einzeltest wurde ein Signifikanz-Niveau von $\alpha = 0,005$ gewählt. Dies empfiehlt sich wegen der simultanen Testung der verschiedenen Variablen und dem damit verbundenen höheren Gesamtfehler. Die statistische Analyse der O_2 -Verbrauchswerte erfolgte unter Zuhilfenahme des t-Testes.

Histologische Technik

Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden von dem in 4 % Formalinlösung fixiertem Lebergewebe Gefrier- und Paraffinschnitte angefertigt und mit Scharlachrot bzw. Hämatoxylin-Eosin oder PAS gefärbt. Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden etwa 1 mm^3 große Gewebstücke in einer 3 %

phosphatgepufferten (0,1 M; pH 7,2) Glutaraldehyd-Lösung geschnitten und nach einer Fixationszeit von 4 h in eine phosphatgepufferte Saccharose-Lösung (0,1 M; pH 7,2) überführt. Sie wurden 24 - 48 h später in einer 1 % OsO_4 -Lösung (0,1 M Phosphatpuffer; pH 7,2) nachfixiert, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und in Mikropal (Fa. Ferak, Berlin) eingebettet. Ultradünnschnitte wurden mit dem Ultratom (LKB Ultratom Typ 3, Stockholm) hergestellt und mit Bleizitrat kontrastiert. Die Aufnahmen wurden mit dem Zeiss-Elektronenmikroskop (EM 9A) angefertigt. Die Semidünnschnitte wurden nach Giemsa gefärbt.

Biochemische Ergebnisse

Aus Tab. 2 ist ersichtlich, daß mit Ausnahme von Adenosindiphosphat (ADP) die Metabolitkonzentrationen von Adenosintriphosphat (ATP), Adenosinmonophosphat (AMP), Laktat (L), Pyruvat (P), Acetoacetat (AcAc), β -Hydroxybutyrat (β -OH-B) und Glykogen sowie die Quotienten Adenosintriphosphat / Adenosindiphosphat (ATP/ADP), Laktat / Pyruvat (L/P) und β -Hydroxybutyrat / Acetoacetat (β -OH-B/AcAc) nach 60 min hämorrhagischem Schock (Serie O) sich signifikant von den Kontrollwerten (Serie K) unterscheiden. Im Vergleich zu den Kontrollwerten nimmt ATP im Schock um mehr als 60 % ab, während der AMP-Gehalt sich fast verdoppelt; Laktat steigt um das 4,5-fache, β -Hydroxybutyrat um 55 % an, während Pyruvat um 33 % und Acetoacetat um 40 % abnimmt. Dementsprechend wird in der Serie O ein 6,5-facher Anstieg des L/P-Quotienten und eine

Erhöhung des β -OH-B/AcAc-Quotienten auf mehr als das 1,5-fache der Werte der Kontrollserie gefunden. Der Glykogengehalt der Schocklebern beträgt nur noch etwa 2,5 % der in der Kontrollserie gefundenen Werte.

Wie Tab. 3 zeigt, ändern sich die Metabolitgehalte der Schocklebern in Abhängigkeit von der Dauer der Perfusion. Die Veränderungen sind in allen Serien innerhalb der ersten 30 min Perfusion am deutlichsten. Nach Perfusionszeiten von 60 min bzw. 120 min nähern sich die genannten Größen asymptotisch den Werten der Kontrollserie. Parallel zu den in Abhängigkeit von der Perfusionsdauer steigenden Zunahme der ATP-Gehalte und der Normalisierung der ATP/ADP-Quotienten nehmen die AMP-Konzentrationen in allen Versuchsserien ab. Gleichzeitig nähern sich die Laktat / Pyruvat- bzw. Hydroxybutyrat / Acetoacetat-Quotienten infolge der Abnahme der reduzierten und des Anstieges der oxydierten Reaktionspartner den Werten der Kontrollserie. Wie schon erwähnt, erscheint bei der großen Zahl der gemessenen biochemischen Parameter eine Signifikanzgrenze von $p = 0,005$ angebracht, da mit der Zahl der durchgeführten Tests natürlich die Gefahr besteht, einen Unterschied fälschlicherweise als statistisch signifikant zu betrachten. Dies bedeutet, daß sich kein Unterschied zwischen den Placebo- und Actihaemylserien als bedeutsam im statistischen Sinne erwiesen hat. In allen Perfusionsserien wurden Glykogenkonzentrationen in einer Größenordnung gefunden, die sich nicht in nennenswerter Weise von den extrem niedrigen Glykogenwerten der Schockserie unterscheiden.

Der Wassergehalt des Lebergewebes nahm in allen Perfusionsserien um weniger als 5 % zu.

Wie aus Tab. 4 hervorgeht, zeigt sich ein Trend zu einem höheren O_2 -Verbrauch in allen Actihaemylserien im Vergleich mit den Placeboserien. Unter Zuhilfenahme des t-Testes zeigte es sich, daß die Unterschiede zwischen der Behandlung mit Actihaemyl und Placebo für die 5,30 und 60 min Werte auf dem 5 % Niveau, signifikant waren. Für die 120 min Meßwerte betrug die Irrtumswahrscheinlichkeit mehr als 10 %.

Histologische Befunde

Kontrollserie: Die Abb. 1 a-c geben einen Überblick über den normalen licht- und elektronenmikroskopischen Aufbau der Leber. In der elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb. 1 c) zeigt der Leberzellkern eine feingranuläre Verteilung des Chromatins. Im Cytoplasma sind zahlreiche Mitochondrien sowie rauhes und glattes endoplasmatisches Reticulum zu erkennen. Das rauhe endoplasmatische Reticulum unterscheidet sich vom glatten endoplasmatischen Reticulum durch einen dichten Ribosomenbesatz an der Außenseite der Membran. Zwischen diesen Strukturen befinden sich reichlich Glykogenrosetten.

Schockserie: Lebern nach hämorrhagischem Schock von 60 min

In den licht- und elektronenmikroskopischen Bildern (Abb. 2 a-c) sind unauffällige Leberstrukturen zu finden. Die Semidünnschnitte dieser Serie weisen an manchen Stellen regellos nebeneinander helle und dunkle Zellen auf. Vereinzelt finden sich kleinste Vakuolen.

Placeboserien: Lebern der Serien A,C,E nach hämorrhagischem Schock von 60 min und anschließender Perfusion

Die lichtmikroskopischen Präparate der Serie A (30 min Perfusion) zeigen bis auf eine leichte Erweiterung der Sinusoide ein unauffälliges Bild (Abb. 3 a). In den Serien C (1 h Perfusion; Abb. 5 a) und E (2 h Perfusion; Abb. 7 a) werden in einigen Läppchenbezirken Leberveränderungen deutlich. Stellenweise ist eine Erweiterung der Sinusoide zu beobachten. Die Leberzellen der Serie C weisen eine leichte Dissoziation und Abrundung der Leberzellen auf. Manche Zellkerne sind von hellen Höfen umgeben. Etwas weiter fortgeschritten ist die Zelldissoziation in der Serie E. In einigen Läppchenabschnitten sind vakuolige Bezirke zu erkennen (Abb. 7 a).

In den Semidünnschnitten der Serien C und E finden sich regellos nebeneinander helle und dunkle Zellen (Abb. 5 b, 7 b). In allen Serien sind optisch leere Vakuolen in unterschiedlicher Anzahl und von unterschiedlicher Größe zu erkennen (Abb. 3 b, 5 b, 7 b).

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen finden sich in den Serien A und C unauffällige Leberzellen (Abb. 3 c, 5 c). In der Serie E sind entsprechend den regionalen lichtmikroskopischen Veränderungen abgerundete und geschwollene Mitochondrien und auffallend helle Kerne mit Verklumpung des Chromatins und Ruptur der Kernmembran zu beobachten. Das endoplasmatische Reticulum zeigt mitunter eine geringfügige Erweiterung (Abb. 7 c).

Actihaemylserien: Lebern der Serien B,D,F nach hämorrhagischem Schock von 60 min und anschließender Perfusion

Die lichtmikroskopischen Präparate zeigen in allen Serien mäßig erweiterte Sinusoide und eine regional begrenzte Dissoziation der Leberzellen, die in den Serien D (1 h Perfusion) und F (2 h Perfusion) ausgeprägter ist als in der Serie B (30 min Perfusion). In allen drei Serien finden sich verstreut helle und dunkle Zellen (Abb. 4 c, 6 c, 8 c). Wie in den Placeboserien nimmt die Vacuolisierung mit der Dauer der Perfusion zu (Abb. 8 c).

Beim Vergleich der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Serie B (30 min Perfusion) mit der Serie D (Abb. 4 c, 6 c) zeigt sich eine beginnende Vesikulation des rauhen und glatten endoplasmatischen Reticulums in der Serie D. Sie ist in Serie F deutlicher und hat dort zur Ausbildung von unterschiedlich großen Vakuolen geführt (Abb. 8 c). Die Mitochondrien mancher Zellen sind stark geschwollen, die Matrix ist aufgehellert, die Cristae mitochondriales z.T. in Bruchstücke zerfallen. In enger Nachbarschaft finden sich andere Zellen, die weitgehend unauffällig sind.

Diskussion

Die biochemischen Ergebnisse bestätigen die von anderen Autoren (10,26,33,44,54,59,64) mitgeteilten Veränderungen der Metabolitgehalte im Schock. Charakteristisch für die Minderversorgung mit Sauerstoff sind der verminderte ATP-Gehalt und der niedrige ATP/ADP-Quotient. Die Redoxsysteme Laktat / Pyruvat und β -Hydroxybutyrat / Acetoacetat reagie-

ren mit einer ausgeprägten Steigerung der Laktat- und β -Hydroxybutyratkonzentrationen und einem Anstieg der L/P und β -OH-B/AcAc-Quotienten. Die Substratpaare Laktat / Pyruvat und β -Hydroxybutyrat / Acetoacetat ermöglichen Aussagen über den Zustand des extramitochondrialen bzw. mitochondrialen Redoxsystems (5,15,54,55,68). Während der anaeroben Glykolyse im Schock steigt NADH im Cytosol zu unphysiologisch hohen Konzentrationen an. Es wird angenommen, daß die Mitochondrienmembran für Pyridinnucleotide nahezu undurchlässig ist (36,46,54). Der Wasserstoff wird vermutlich über besondere Transportmechanismen in die Mitochondrien eingeschleust. Der Glycerophosphatzyklus wird u.a. als ein Modell der Wasserstoffübertragung aus dem Cytosol in den mitochondrialen Raum diskutiert, wo die β -Hydroxybutyratdehydrogenase strukturgebunden vorliegt (8). Ein solcher Mechanismus wird von verschiedenen Autoren (19,66) auch für die Leber angenommen. Die vorliegenden Untersuchungen lassen vermuten, daß aufgrund dieses Shuttle-Mechanismus die intramitochondrialen Konzentrationen des β -Hydroxybutyrats zunehmen und gleichzeitig der β -OH-B/AcAc-Quotient ansteigt.

Die schnelle Erholungsfähigkeit der Leber (54) nach 60 min hämorrhagischem Schock zeigt sich in der Tendenz zur Normalisierung der Metabolitkonzentrationen der Adeninnukleotide, des Laktats und des Pyruvats nach der Perfusion. Wolff (70) hat am Ganztier nach hämorrhagischem Schock und Erholungszeiten von 30, 60 bzw. 120 min bei Ratten ähnliche Ergebnisse gefunden. Selbst nach vollständiger Unterbrechung der Blutzufuhr zur Leber von 15 min oder sogar 60 min und anschließen-

der Wiederdurchblutung ist von verschiedenen Autoren (9,15) eine weitgehende Restitution der Adeninnukleotide mitgeteilt worden. Eine Voraussetzung für eine schnelle ATP-Resynthese ist ein ausreichendes Angebot von adenosinhaltigen Substraten, worauf auch Gaja et al. (15) hingewiesen haben.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden im Schock ein Anstieg des AMP-Gehaltes und ein starker Abfall der Glykogenkonzentrationen beobachtet. Hunter und Jefferson (27) zeigten, daß hohe AMP-Konzentrationen die Glykogenolyse in der Leber aktivieren und gleichzeitig die Glukoneogenese aus Laktat hemmen und so zum Zusammenbruch der Glykogenreserven führen. Die Leber ist im Vergleich zum Gehirn, Herz- und Skelettmuskel nur in relativ geringem Maße in der Lage, Energie aus der anaeroben Glykolyse zu gewinnen. Dies findet seinen Ausdruck in dem vergleichsweise raschen Abfall des ATP-Gehaltes und dem relativ langsamen Ansteigen der Laktatkonzentration (62). In erheblichem Umfang werden Glukose und Laktat während der Schockphase aus der Leber in das Blut abgegeben und stehen nach der Isolierung des Organs als energieliefernde Substrate nicht mehr zur Verfügung. Während der Perfusion kommt es nach Befunden anderer Autoren (7,52,54) zu einem Übertritt von Laktat und Glukose aus der Leber in das Perfusat, wobei sich ein Gleichgewicht zwischen Zell- und Perfusatkonzentration einstellt. Im Laufe der Perfusion werden Laktat und Glukose der Leber mit dem Perfusionsmedium wieder zugeführt und, wie die Abnahme der Laktatwerte der perfundierten Lebern zeigen, für die ATP-Resynthese verbraucht. Infolgedessen besteht für die Glykogenresynthese ein limitierender Substratmangel. Auch Hems et al. (20) fanden nach Perfusion mit

glukosearmen Medien keine nennenswerte Glykogenresynthese. In Versuchen mit Leberhomogenaten (30), einfachen pflanzlichen Zellsystemen (45) sowie bei Durchströmungsversuchen der Niere und Muskulatur (47) haben verschiedene Autoren eine Zunahme des Sauerstoffverbrauches unter Einfluß von Actihaemyl gefunden. Die Ursachen hierfür sind ungeklärt. Es werden eine Verbesserung des oxydativen Stoffwechsels (30) und eine gesteigerte Zellpermeabilität für Glukose (34,40) diskutiert. Auch in den vorliegenden Versuchen wurde im Vergleich mit den Placeboserien nach Zusatz von Actihaemyl zum Perfusionsmedium ein Trend zu einer vermehrten O_2 -Aufnahme beobachtet. In Anbetracht der verhältnismäßig geringen Anzahl der Versuche und unter Berücksichtigung der für die Schockleber von Kessler (31) mitgeteilten großen Streuung der O_2 -Verbrauchswerte müssen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % die Unterschiede zwischen beiden Gruppen mit Zurückhaltung als signifikant beurteilt werden.

Die Lebern waren nach einem hämorrhagischen Schock von 60 min histologisch unauffällig (Abb. 2 a-c). Andere Autoren (35,56, 69) fanden neben leichten Veränderungen auch läppchenzentrale Nekrosen. Diese unterschiedlichen Befunde lassen sich damit erklären, daß die Schockzeiten länger als 60 min waren.

In den zeitlich korrespondierenden Präparaten der Actihaemyl- und Placeboserien waren die morphologischen Befunde sich sehr ähnlich. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen regional unterschiedliche Grade von Zellveränderungen entsprechend den schon während der Perfusion makroskopisch sicht-

baren hell- und dunkelroten Arealen auf der Leberoberfläche. Diese fleckige Zeichnung der Leberoberfläche deutet auf Mikrozirkulationsstörungen hin. Auch Oomen und Chalmalaun (41) beobachteten in ihren Untersuchungen regional unterschiedliche Zellveränderungen und vermuteten eine inhomogene Leberdurchblutung. Roschlau et al. (48) sahen auch unter sogenannten optimalen Perfusionsbedingungen morphologische Veränderungen, die ebenfalls auf Mikrozirkulationsstörungen hinweisen. Während in den vorliegenden Untersuchungen eine Erweiterung der Sinusoide, Vakuolenbildung und stellenweise Zelldissoziation beobachtet wurden, fanden Roschlau et al. (48) neben diesen Veränderungen häufig auch Thrombosen und läppchenzentrale Nekrosen. Die frischen Nekrosen traten als Gruppen- und Einzelnekrosen auf.

In den Semidünnschnitten fielen helle und dunkle Zellen auf, die auch von anderen Autoren (13,16,17,18,21,25,43,61,69) beschrieben worden sind. Ganote und Moses (16) haben darauf hingewiesen, daß dunkle und helle Zellen als Artefakte bei der Fixation auftreten können. Sie fanden bei der Immersionsfixation eine scharfe Abgrenzung von hellen und dunklen Zellverbänden. Derartige Artefakte lassen sich am besten durch eine Perfusionsfixation vermeiden (14,16). Diese Fixationsmethode konnte in den vorliegenden Versuchen nicht angewandt werden, da die Lebern noch zur weiteren biochemischen Aufarbeitung gebraucht wurden. Durch Schneiden der Präparate in Gewebsblöckchen von weniger als 1 mm Kantenlänge lassen sich solche Fixationsfehler vermeiden (13,16). Die Tatsache, daß in den vorliegenden Semidünnschnitten helle und dunkle

Zellen regellos über das Läppchen verteilt sind (Abb. 6, 11) und eine scharfe Abgrenzung von geschädigten und gut erhaltenen Zellen nicht nachzuweisen ist, spricht gegen fixationsbedingte Zellveränderungen. Auch andere Autoren (17,18,21, 25,60,61,69) beobachteten helle und dunkle Zellen in gesunden wie in geschädigten Lebern. Bei Schädigungen wie z.B. durch α -Naphthyl-Iso-Thiocyanat (60), durch ein Rheovirus (43), nach Anwendung von 32 MEV Protonen (17), nach Vergiftung mit Tetrachlorkohlenstoff (18), Aflatoxin (61) und Eisensulfat (69) sowie nach temporärer Durchblutungssperre (25) und längerer Hungerperiode (21) wurde das Auftreten von hellen und dunklen Zellen beschrieben. Die hellen und dunklen Zellen werden von diesen Autoren als unspezifische Reaktionen auf Schädigungen gedeutet, die zu Änderungen im Hydrations- und Funktionszustand der Zelle führen (21,60).

In allen Perfusionsserien wurden unterschiedlich große Vakuolen gesehen, die mit zunehmender Perfusionszeit an Größe und Zahl zunahmen. Die mit Scharlachrot gefärbten Gefrierschnitte zeigten, daß die Vakuolen frei von Fett waren. Solche optisch leeren Vakuolen sind als Folgen einer Hypoxie oder Vergiftung mit CCl_4 , Allylalkohol und HCN von verschiedenen Autoren (3,23,24,39,63) beschrieben worden. Die Vakuolen kommen besonders in den läppchenzentralen Abschnitten vor, da der Sauerstoffdruck von der Läppchenperipherie zur Zentralvene hin abnimmt. Infolge der hypoxidotischen Schädigung kann die Zelle ihr osmotisches Gleichgewicht zwischen der Zellumgebung und dem Zellinneren nicht mehr völlig aufrecht erhalten. Intrazellulär wird Natrium und Wasser eingelagert. Durch einen noch bestehenden Reststoffwechsel der Zelle wird das

eingedrungene Wasser in Form von Vakuolen abgegrenzt. Während Hübner und Bernhard (25) das Auftreten von größeren Vakuolen nach einer Hypoxie von 10 min fanden, wurden von Mölb-
bert und Gueritore (39) in diesem Zeitraum keine größeren Vakuolen beobachtet. Hübner und Bernhard (25) berichten über eine nahezu völlige Rückbildung der Vakuolen 15 min nach Wiederdurchblutung.

Erst nach einer Perfusion von 60 min zeigten sich Veränderungen des endoplasmatischen Reticulums in Form von schlauchförmigen Erweiterungen und Bläschenbildungen. Eindeutige Veränderungen an den Mitochondrien setzten erst nach Perfusionszeiten von 120 min in beiden Serien ein. In den vorliegenden elektronenmikroskopischen Präparaten waren in manchen Läppchenbezirken neben völlig unauffälligen Zellen solche zu finden, die verändert waren. Die Mitochondrien waren geschwollen, die Matrix aufgehellt, die Cristae mitochondriales z.T. in Bruchstücke zerfallen. In manchen Zellen fand sich ein Nebeneinander von gut erhaltenen und veränderten Mitochondrien. Auch Hübner (25) hat in Ultradünnschnitten ähnliche Befunde mitgeteilt. Die vorliegenden Untersuchungen machen deutlich, wie wichtig neben der elektronenmikroskopischen auch die lichtmikroskopische Betrachtung für die Beurteilung von Zellveränderungen ist. Als Ursachen für die Mitochondrienveränderungen werden Störungen im oxydativen Stoffwechsel angeführt (25,50). Mölb-
bert und Hübner (23,24,39) haben in ihren Untersuchungen gezeigt, daß die durch den Sauerstoffmangel bedingten Veränderungen der Mitochondrien reversibel sind.

Vergleichende biochemische und morphologische Untersuchungen der isoliert perfundierten Rattenleber von anderen Autoren (41, 48) ergaben keine Korrelation der Befunde. Kessler (31) hat zeigen können, daß besonders in der isoliert perfundierten Rattenleber Inhomogenitäten der Sauerstoffdruckverteilung bestehen, wobei in manchen Arealen die für die Zellatmung kritischen Sauerstoffdrucke unterschritten werden. Ursache hierfür sind Mikrozirkulationsstörungen, wie sie an Hand der histologischen Befunde auch in der vorliegenden Untersuchung vermutet werden müssen. Roschlau et al. (48) fanden keine sichere Korrelation zwischen dem Durchfluß durch die Leber und den morphologischen Veränderungen. Altmann (2) hat zeigen können, daß biochemische Veränderungen bei völlig unauffälligen histologischen Befunden vorkommen. Andererseits beobachteten Merker et al. (37) z.B. Alterationen des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien, ohne daß biochemische Parameter verändert waren.

Beim Vergleich der vorliegenden histologischen und biochemischen Befunde zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den mit Actihaemyl oder Placebo behandelten perfundierten Schocklebern. Die in Abhängigkeit von der Perfusionsdauer zunehmende ATP Resynthese, der zu ihr parallel verlaufende Abbau von AMP und die Normalisierung der L/P und β -OH-B/AcAc-Quotienten sprechen dafür, daß die herdförmig auftretenden und vermutlich durch Mikrozirkulationsstörungen bedingten Zellveränderungen geringgradig sind und noch nicht zu einer Störung von enzymatischen Reaktionsabläufen geführt haben.

Es muß weiteren Untersuchungen vorgehalten bleiben, ob am Versuchsmodell der isoliert perfundierten Schockleber der

Ratte sich mit höheren Dosierungen von Actihaemyl und einer größeren Anzahl von Versuchen deutlichere Unterschiede erzielen lassen.

Zusammenfassung

1. Am Versuchsmodell der isoliert perfundierten Rattenleber in situ wurde der Einfluß des eiweißfreien standardisierten Blutextraktes Actihaemyl[®] auf die Konzentrationen von ATP, ADP, AMP, Laktat, Pyruvat, β -Hydroxybutyrat, Acetoacetat, Glykogen und den O_2 -Verbrauch der Rattenleber nach 60 minütigem hämorrhagischen Schock und Erholungszeiten von 30, 60 und 120 min Perfusionsdauer untersucht.
2. Die Schocklebern wurden mit einem erythrozytenhalten Medium nach Zugabe von Actihaemyl bzw. 3,51 % NaCl als Placebo in einer Konzentration von 2 % bei 37° C perfundiert.
3. Am Ende der Schockphase wurden parallel zu einer Zunahme von AMP die ATP-Konzentrationen deutlich erniedrigt gefunden. Die Redoxsysteme Laktat / Pyruvat und β -Hydroxybutyrat / Acetoacetat waren zugunsten der reduzierten Reaktionspartner verändert. Der Glykogengehalt war extrem gering.
4. In den perfundierten Schocklebern war unabhängig von der Zugabe von Actihaemyl oder Placebo in allen Versuchsserien als Zeichen einer störungsfreien oxydativen Phosphorylierung nach 120 min Perfusion eine Annäherung der ATP-Konzentrationen an Kontrollwerte und eine Normalisierung der Redoxquotienten nachzuweisen. Weder für die biochemischen Parameter noch für den O_2 -Verbrauch ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den Actihaemyl- und Placebo-Serien statistisch sichern. Eine nennenswerte Glykogenresynthese konnte nicht festgestellt werden.

5. Die geringfügigen herdförmigen, vermutlich durch Mikrozi-
kulationsstörungen bedingten Zellveränderungen hatten keine
nachteiligen Auswirkungen auf die enzymatischen Stoffwechsela-
läufe.
6. Ob durch höhere Dosierungen von Actihaemyl am Versuchsmodell
der isoliert perfundierten Schockleber der Ratte sich deutli-
chere Unterschiede erreichen lassen, bleibt durch weitere
Untersuchungen zu klären.

Literatur

- 1 Adam, H. in H. U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse , Bd II, S. 2051 ff., Verlag Chemie, Weinheim : Auflage 1970
- 2 Allgöwer, M., Gruber, U. F.: Schockpathogenese und ihre Differentialdiagnose, Chirurg 38:97 (1967)
- 3 Altmann, H.: Allgemeine morphologische Pathologie des Cytoplasmas; in Handbuch der allgemeinen Pathologie Bd. II/1 419 ff., Springer, Berlin-Heidelberg-Göttingen 1955
- 4 Berry, M. N., Williamson, D. H., Wilson, M. B. : Concentrations of Acetoacetate and D-(-)- β -Hydroxybutyrate in Rat Liver and Blood, Biochem. J. 94: 17 c (1965)
- 5 Breuer, H., Schönfelder, M., Schreiber, H. W.: Über die Wirkung eines Blutextraktes auf die Atmung menschlicher Leberschnitte und die Aktivität der Serumcholinesterase bei Leberkrankheiten, Klin. Wochenschr. 39: 1189 (1961)
- 6 Brosnan, J. T., Krebs, H. A. , Williamson, D. H.: Effects of Ischaemia on Metabolic Concentrations in Rat Liver, Biochem. J. 117: 91 (1970)
- 7 Bücher, Th., Brauser, B., Conze, A., Klein, F., Langguth, O., Sies, H.: State of Oxidation-Reduction and State of Binding in Cytosolic NADH-System as Disclosed by Equilibration with Extracellular Lactate / Pyruvate in Hemoglobin-Free Perfused Rat Liver, Eur. J. Biochem. 2 301 (1972)
- 8 Bücher, Th., Klingenberg, M.: Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation, Angew. Chem. 70: 552 (1970)
- 9 Busch, E. W., Habel, G., v. Wichert, P.: Restitution von Adenosinphosphaten im Lebergewebe während der Wiederdurchblutung nach ischämischen Belastungen bis zu 5 St Dauer, Biochem. Z. 341: 85 (1964)

- 10 Butcher, H. R., Braitberg, A.: Hemorrhagic Shock in Rats, Arch. Surg. 98: 685 (1969)
- 11 Czok, R., Lamprecht, W. in H. U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. II, S. 1407 ff., Verlag Chemie, Weinheim, 2. Auflage 1970
- 12 Dillon, J., Lynch, L. J., Myers, R., Butcher, H. R., Moyer, C. A.: A Bioassay of Treatment of Hemorrhagic Shock, Arch. Surg. 93: 537 (1966)
- 13 Ericsson, J. L. E., Biberfeld, P.: Studies on Aldehyde Fixation, Lab. Invest. 17: 281 (1967)
- 14 Fahini, H. D.: Perfusion and Immersion Fixation of Rat Liver with Glutaraldehyde, Lab. Invest. 16: 736 (1967)
- 15 Gaja, G., Ferrero, M. E., Piccoletti, R., Bernelli-Zazzera, A.: Phophorylation and Redox States in Ischemic Liver, Exp. and Molec. Path. 19: 248 (1973)
- 16 Ganote, C. E., Moses, H. L.: Light and Dark Cells as Artifacts of Liver Fixation, Lab. Invest. 18: 740 (1968)
- 17 Ghidoni, J. J.: Light and Electron Microscopic Study of Primate Liver 36 to 48 Hours after High Doses of 32 Million-Electron-Volt Protons, Lab. Invest. 16: 268 (1967)
- 18 Goslar, H. G., Jaeger, K. H., Scheithauer, E., Pichotka, J.: Enzymhistochemische Untersuchungen an der Rattenleber nach unbehandelter und behandelter Tetrachorkohlenstoffvergiftung, Arzneimittelforsch. 16: 359 (1966)
- 19 Grote, J.: Probleme der Sauerstoffversorgung der Organe im Schock in: Schock, Stoffwechsel und Therapie, S. 101 ff., Staib, I., Zimmermann, W. E., F. K. Schattauer Verlag Stuttgart-New York 1970
- 20 Hems, R., Ross, B. D., Berry, M. N., Krebs, H. A.: Gluconeogenesis in the Perfused Rat Liver, Biochem. J. 101: 284 (1966)

- 21 Herdson, P. B., Garvin, P. J., Jennings, R. B.: Fine Structural Changes Produces in Rat Liver by Partial Starvation, Am J. Pathol. 45: 157 (1964)
- 22 Hohorst, H. J. in H. U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse Bd. II, S. 1425 ff., Verlag Chemie, Weinheim, 2. Auflage 1970
- 23 Hübner, G. : Elektronenmikroskopische Untersuchungen bei Durchblutungssperre der Leber, Verh. Dt. Ges. Path. 45: 286 (1961)
- 24 Hübner, G.: Die pathischen Reaktionen des Lebergewebes, Veröffentl. morphol. Path.: Heft 78, Verlag Urban und Schwarzenberg, Wien, Berlin (1966)
- 25 Hübner, G., Bernhard, W.: Das submikroskopische Bild der Leberzelle nach temporärer Durchblutungssperre, Beitr. path. Anat. 125: 1 (1961)
- 26 Huckabee, W. E.: Lactic Acidosis, Am. J. Cardiol. 12: 663 (1963)
- 27 Hunter, A. R., Jefferson, L. S.: Role of Adenosine Monophosphate in Regulation of Metabolic Pathways of Perfused Rat Liver, Biochem. J. 111: 537 (1969)
- 28 Isselhard, W., Merguet, H., Palm, K.: Bestimmung des Gesamtglykogens neben säurelöslichen Metaboliten in Perchlorsäureorganhomogenaten, Z. ges. exp. Med. 136: 174 (1962)
- 29 Jakob, A., Williamson, J. R., Asakura, T.: Xylitol Metabolism in Perfused Rat Liver, J. Biol. Chem. 246: 7623 (1971)
- 30 Jaeger, K. H., Leybold, K., Mittenzwei, H., Staudinger, H. J., v. Waldstätten, L.: Die Förderung der Zellatmung durch einen Blutextrakt, Arzneimittelforsch. 15: 750 (1965)
- 31 Kessler, M., Thermann, M., Lang, H., Hartel, W., Schneider, H.: O₂-Versorgung lebenswichtiger Organe im Schock mit besonderer Berücksichtigung der Leber in: Schock, Stoffwechsel und Therapie, S. 117 ff., Staib, I., Zimmermann, W. E., F. K. Schattauer Verlag Stuttgart-New York 1970

- 32 Kinney, J. M.: Störungen der Lungenfunktion und Veränderungen der Stoffwechselrate im Schock in: Schock, Stoffwechsel und Therapie S. 89 ff., Staib, I., Zimmermann, W. E., F. K. Schattauer Verlag Stuttgart-New York 1970
- 33 Krebs, H. A., Wallace, P. G., Hems, R., Freedland, R. A.: Rates of Ketone-Body Formation in the Perfused Rat Liver, Biochem. J. 112: 595 (1969)
- 34 Krüger, G., G. Quadbeck: Das Sauerstoffmangel-Elektroenzephalogramm der Ratte als Indikator für eine medikamentöse Beeinflussung des Hirnstoffwechsels, Arzneimittel-Forschung 22: 451 (1972)
- 35 Larcán, A., Vert, P.: Leber und Aggressionssyndrom, Münch. Med. Wschr. 105: 65 (1963)
- 36 Lehninger, A. L.: Phosphorylation coupled to Oxidation of Dihydrodiphosphopyridine Nucleotide, J. Biol. Chem. 190: 345 (1951)
- 37 Merker, H.-J., Wedell, J., Neubert, D.: Biochemische und strukturelle Veränderungen an den Zellorganellen der Leber nach vollständiger Kreislaufunterbrechung, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmacol. 249: 85 (1964)
- 38 Messmer, K.: Die Grundlagen der modernen Schocktherapie, Münch. Med. Wochenschr. 112: 357 (1970)
- 39 Mölbert, E., Guerriore, D.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Leberparenchym bei akuter Hypoxie, Beitr. path. Anat. 117: 32 (1956)
- 40 Mohnike, G., Lippmann, H. G., Dieckmann, I., Hommel, H.: Zur Wirkung eines Extraktes aus Kälberblut im Stoffwechsel der Glucose, Arzneim.-Forsch. 18: 1021 (1968)
- 41 Oomen, H., Chamalaun, R.: Correlation between Histological and Biochemical Parameters of Isolated Perfused Rat Liver, Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 8: 234 (1971)
- 42 Osten, W.: Verhalten des Splanchnicusgebietes und des Gesamtorganismus im tierexperimentellen Schock, Z. Ges. Exp. Med. 131: 30 (1959)

- 43 Papadimitriou, J. M.: Electron Micrographic Features of Acute Murine Reovirus Hepatitis, Am. J. Patho. 47: 565 (1965)
- 44 Papova, E., Urbaschek, B., Heitmann, L., Oroz, M., Streit, E., Lemeunier, A., Lundsgaard-Hansen, P.: Energy rich Phosphates and Glucose Metabolism in early Endotoxin Shock, J. Surg. Res. 4: 506 (1971)
- 45 Pichotka, J., Jaeger, K. H., Pape, J., Scheithauer, E.: Wirkung eines Blutextraktes auf den Stoffwechsel einfacher Systeme (Leberhomogenat, Kartoffelgewebe), Arzneimittel-Forsch. 15: 754 (1965)
- 46 Purvis, J. L., Löwenstein, J. M.: The Relation between Intra- and Extramitochondrial Pyridine Nucleotides, J. Biol. Chem. 236: 2794, (1961)
- 47 Reichel, H., Weiss, Chr., Leichtweiss, H. P.: Die Wirkung eines Blutextraktes auf die Sauerstoffaufnahme isolierter künstlich perfundierter Nieren und Skelettmuskeln der Ratte, Arzneim.-Forsch. 15: 756 (1965)
- 48 Roschlau, G., Walther, M., Tschöpel, L.: Vergleichende histologische und biochemische Befunde an der perfundierten Rattenleber in Abhängigkeit vom Perfusionsmedium, Exp. Path. 5:20 (1971)
- 49 Roth, E.: Organstoffwechsel in Herz, Gehirn, Leber und Niere im hämorrhagischen Schock in: Schock, Stoffwechselveränderungen und Therapie, S. 219 ff., Verlag F. K. Schattauer, Stuttgart (1970)
- 50 Rouiller, C.: Die ultrastrukturellen Veränderungen des Cytoplasmas der Leberzellen, Triangel 9: 209 (1970)
- 51 Schäfer, G., Lamprecht, W.: Zur Wirkung von Blutextrakten auf die Mitochondrienatmung und die oxydative Phosphorylierung, Arzneim.-Forsch. 15: 757 (1965)
- 52 Schimassek, H.: Der Einfluß der Leber auf den extrazellulären Redoxquotienten Lactat / Pyruvat, Biochem. Z. 336: 468 (1963)

- 53 Schmidt, D. H., Schmier, J.: Kontraktilitätsschädigung des Herzens im frühen hämorrhagischen Schock, Pflügers Arch. 285: 241 (1965)
- 54 Scholz, R.: Untersuchungen zur Redoxkompartimentierung bei der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber in: Stoffwechsel der isoliert perfundierten Rattenleber, S. 25, Staib, W., Scholz, R., Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1968)
- 55 Scholz, R., Thurmann, R. G., Williamson, J. R., Chance, B., Bücher, Th.: Flavin and Pyridine Nucleotide Oxidation-Reduction Changes in Perfused Rat Liver, J. Biol. Chem. 244: 2317 (1969)
- 56 Shoemaker, W. C., Szanto, P. B., Fitch, L. B., Brill, N. R.: Hepatic, Physiologic and Morphologic Alterations in Hemorrhagic Shock, Surg. Gynec.Obstet. 116: 828 (1964)
- 57 Shoemaker, W. C.: Verlaufsbeobachtungen des kardiorespirator. Systems und Blutvolumens bei verschiedenen Schockformen in: Schock, Stoffwechsel und Therapie, S. 219 ff., Staib, I., Zimmermann, W. E., Verlag F. K. Schattauer, Stuttgart (1970)
- 58 Siggaard Andersen, O., Engel, K., Jørgensen, K., Astrup, P.: A Micro Method for Determination of pH, Carbon-dioxide Tension, Base Excess and Standard Bicarbonate in Capillary Blood, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 12: 172 (1960)
- 59 Sommerkamp, H.: Veränderungen des Säure-Basen-Haushalts im Schock, S. 207 ff. in: Schock, Stoffwechsel und Therapie, Staib, I., Zimmermann, W. E., F. K. Schattauer Verlag Stuttgart-New York 1970
- 60 Steiner, J. W., Baglio, C. M.: Electron Microscopy of the Cytoplasm of Parenchymal Liver Cells in α -Naphthylisothiocyanate - Induced Cirrhosis, Lab. Invest. 12: 765 (1961)
- 61 Theron, J. J.: Acute Liver Injury in Ducklings as a Result of Aflatoxin Poisoning, Lab. Invest. 14: 1586 (1965)

- 62 Thorn, W., Isselhard, W., Müldener, B.: Glykogen-, Glukose- und Milchsäuregehalt in Warmblüterorganen bei unterschiedlicher Versuchsanordnung und anoxischer Belastung mit Hilfe optischer Fermentteste ermittelt, Biochem. Z. 331: 545 (1959)
- 63 Totovic, V., Lagacé, R., Lie, T. S., Büsselberg, E., Yamamoto, T.: Zur Ultrastruktur der Schweineleber bei 24-stündiger einfacher hypothermer Konservierung, Res. Exp. Med. 158: 129 (1972)
- 64 Weil, M. H., Afifi, A. A.: Experimentelle und klinische Untersuchungen über Lactat und Pyruvat als Indikatoren für den Schweregrad des akuten Kreislaufversagens (Schock) S. 157 ff. in: Schock, Stoffwechsel und Therapie, Staib, I., Zimmermann, W. E., F. K. Schattauer Verlag Stuttgart-New York 1970
- 65 White, R. R., Leena, M., Leonardo, V. B., Olofsson, K., Miller, L. D.: Hepatic ultrastructure in endotoxemia, hemorrhage, and hypoxia: Emphasis on mitochondrial changes, Surg. Vol. 73 No. 4: 525 ;1973)
- 66 Williamson, J. R., Jakob, A., Refino, C.: Control of the Removal of Reducing Equivalents from the Cytosol in Perfused Rat Liver, J. Biol. Chem. 246: 7632 (1971)
- 67 Williamson, D. H., Mellanby, J., Krebs, H. A.: Enzymic Determination of D (-)- β -Hydroxybutyric Acid and Acetoacetic Acid in Blood, Biochem. J. 82: 90 (1962)
- 68 Williamson, D. H., Lund, P., Krebs, H. A.: The Redox State of free Nicotinamide-Adeninedinucleotide in the Cytoplasm and Mitochondria of Rat Liver, Biochem J. 103: 514 (1967)
- 69 Witzleben, C. L.: An Electron Microscopic Study of Ferrous Sulfate Induced Liver Damage, Am. J. Pathol. 49: 1053 (1966)
- 70 Wolff, R.: Biochemische Untersuchungen zur Wirkung eines eiweißfreien Hämoderivates auf die Erholungsfähigkeit der Rattenleber nach 60 minütigem hämorrhagischem Schock, Arzneim.-Forsch. 25: 388 (1975)

Tab. 2

Mittelwerte $\pm$ S. D. ($\mu\text{M/gFG}$) des Stoffwechselstatus der Rattenleber der Kontrollen (Serie K) und nach 60 minütigem hämorrhagischem Schock (Serie O)

	Serie K	Serie O	p
ATP	$3,27 \pm 0,40$	$1,13 \pm 0,23$	0,005
ADP	$1,25 \pm 0,29$	$1,16 \pm 0,67$	
AMP	$0,59 \pm 0,13$	$1,05 \pm 0,27$	0,005
$\frac{\text{ATP}}{\text{ADP}}$	$2,9 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,1$	0,005
Lactat (L)	$2,63 \pm 0,72$	$11,50 \pm 1,25$	0,005
Pyruvat (P)	$0,19 \pm 0,05$	$0,13 \pm 0,02$	0,005
$\frac{\text{L}}{\text{P}}$	$13,6 \pm 1,6$	$88,52 \pm 14,82$	0,005
β -Hydroxybutyrat (β -OH-B)	$0,49 \pm 0,09$	$0,82 \pm 0,26$	0,005
Acetoacetat (AcAc)	$0,25 \pm 0,07$	$0,15 \pm 0,05$	0,005
$\frac{\beta\text{-OH-B}}{\text{AcAc}}$	$2,1 \pm 0,4$	$5,7 \pm 1,7$	0,005
Glykogen als Glukose	$291,47 \pm 46,93$	$7,46 \pm 2,52$	0,005

Versuche je Serie n = 6

Tab. 3 : Mittelwerte $\pm$ S.D. ($\mu\text{M/gFG}$) des Stoffwechselstatus der Rattenleber nach 60 minütigem Schock und Perfusion mit einem erythrocytenhaltigen Medium bei 37° C

	30 min Perfusion			60 min Perfusion		120 min Perfusion
	Serie A (Placebo)	Serie B (Actihaemyl)	Serie C (Placebo)	Serie D (Actihaemyl)	Serie E (Placebo)	Serie F (Actihaemyl)
ATP	2,76±0,42	2,74±0,46	2,80±0,09	3,11±0,23	3,53±0,21	3,41±0,28
ADP	1,25±0,11	1,12±0,23	1,29±0,16	1,11±0,18	1,17±0,12	1,30±0,08
AMP	0,51±0,05	0,56±0,16	0,43±0,14	0,38±0,09	0,37±0,12	0,41±0,14
ATP ADP	2,2 ±0,2	2,5 ±0,3	2,2 ±0,3	2,9 ±0,4	3,0 ±0,3	2,7 ±0,27
Lactat (L)	1,98±0,57	2,97±0,73	3,74±1,34	3,17±1,02	3,80±0,77	2,83±0,54
Pyruvat (P)	0,11±0,02	0,16±0,03	0,24±0,06	0,21±0,06	0,21±0,09	0,23±0,03
$\frac{L}{P}$	19,2 ±5,4	18,5 ±3,0	15,1 ±2,8	15,5 ±2,8	20,3 ±7,2	12,3 ±2,0
β -OH-Butyrat (β -OH-B)	0,94±0,39	0,83±0,13	0,95±0,23	1,00±0,30	1,03±0,15	1,15±0,17
Acetoacetat (AcAc)	0,39±0,07	0,39±0,12	0,44±0,14	0,42±0,14	0,46±0,14	0,99±0,07
$\frac{\beta\text{-OH-B}}{\text{AcAc}}$	2,6 ±1,40	2,2 ±0,40	2,4 ±0,9	2,7 ±0,70	2,6 ±0,70	1,2 ±0,10
Glykogen als Glykose	3,26±1,33	4,15±1,74	5,71±2,22	12,39±7,71	7,10±4,9	4,97±2,80

Versuche je Serie n = 6

Tab. 4

Mittelwerte $\pm$ S. D. des Sauerstoffverbrauches ($\text{mlO}_2/100\text{g}/\text{min}$) der Rattenleber während der Perfusion (Versuchsserien wie in Tab. 3)

Serie	5 min	30 min	60 min	120 min				
A	4,7±1,5 (6) **	4,8±1,7 (6)						
B	5,0±1,2 (5)	6,1±1,5 (5)						
C	5,9±1,0 (3)	5,7±1,0 (5)	5,1±1,2 (5)					
D	7,1±1,8 (6)	7,3±2,1 (6)	6,8±2,3 (6)					
E	3,9±1,5 (4)	4,1±2,0 (6)	4,5±1,8 (6)	4,4±1,6 (6)				
F	7,0±3,1 (5)	6,7±2,8 (6)	6,7±3,0 (5)	6,3±2,6 (6)				
	4,7±1,5 (13)	5,6±2,1 (16)	4,6±2,0 (17)	6,7±2,2 (17)	4,7±1,5 (11)	6,8±2,5 (11)	4,4±1,6 (6)	6,3±2,6 (6)

** () Anzahl der Messungen

Abkürzungen für die Elektronenmikroskopie

D	=	Dissescher Raum
e	=	glattes (smooth) endoplasmatisches Retikulum
E	=	rauhes (rough) endoplasmatisches Retikulum
Ery	=	Erythrozyt
G	=	Glykogen
Gk	=	Gallenkapillare
M	=	Mitochondrium
mb	=	Mikrokörper (mikrobody)
N	=	Nukleus
S	=	Sinusoid
V	=	Vakuole
ZM	=	Zellmembran

Legenden zu den Abbildungen

Abb. 1) Leber der Ratte 9 der Kontrollserie K

- a) unauffällig, x 300
- b) unauffällig, x 512
- c) Ausschnitt aus einer Leberzelle:
Zellkern (N), Mitochondrien (M), rauhes endoplasmatisches
Reticulum (E), Glykogenrosetten (G) x 15000

Abb. 2) Leber der Ratte 10 der Serie O nach 1 h hämorrhagischem Schock

- a) Leberbälkchenstruktur unauffällig, x 300
- b) Zentralvene, vereinzelte kleinvakuoläre und dunkle
Zellen x 512
- c) Ausschnitt aus aneinandergrenzenden Leberzellen:
Zellkern (N), Mitochondrien (M), rauhes endoplasmatisches
Reticulum (E), Gallenkapillare (Gk) x 15000

Abb. 3) Leber der Ratte 3 der Placeboserie A nach 1 h hämorrhagischem Schock und 30 min Perfusion

- a) unauffällig, x 300
- b) vereinzelte Vakuolen x 512
- c) Ausschnitt aus einer Leberzelle:
Zellkern (N), rauhes endoplasmatisches Reticulum (E),
Mitochondrien (M) x 15000

Abb. 4) Leber der Ratte 3 der Actihaemylserie B nach 1 h hämorrhagischem Schock und anschließender 30 min Perfusion

- a) mäßig erweiterte Sinusoide, geringe Zelldissoziation,
vereinzelte Vakuolenbildung x 300
- b) Zentralvene, vereinzelte helle Zellen und Vakuolen x 512
- c) Ausschnitt aus einer Leberzelle und angrenzendem Sinusoid:
Zellkern (N), Mitochondrien (M), rauhes endoplasmatisches
Reticulum (E), Sinusoid (S), Disséscher Raum (D) x 15000

Abb. 5) Leber der Ratte 5 der Placeboserie C nach 1 h
hämorrhagischem Schock und anschließender 1 h Per-
fusion

- a) links oben Zelldissoziation und Erweiterung der Sinusoide,
perinukleäre helle Höfe x 300
- b) helle und dunkle Zellen mit unterschiedlich großen Vakuolen,
erweiterte Sinusoide x 512
- c) Ausschnitt aus einer Leberzelle:
Zellkern (N), teils ovaläre, teils abgerundete Mitochon-
drien (M), rauhes endoplasmatisches Reticulum (E) x 15000

Abb. 6) Leber der Ratte 10 der Actihaemylserie D nach 1 h hä-
morrhagischem Schock und anschließender 1 h Perfusion

- a) unterschiedlich angefärbte Zellen, Zelldissoziation, kleine
Vakuolen in den Hepatozyten, Sinusoide mäßig x 300
erweitert
- b) helle und dunkle Zellen, vereinzelt doppelkernige Zellen,
Sinusoide erweitert x 512
- c) Ausschnitt aus einer doppelkernigen Zelle:
Zellkern (N), Mitochondrien (M), Vesikulation des glatten
(e) und rauhen endoplasmatischen Reticulums (E), mikro-
bodies (mb) x 15000

Abb. 7) Leber der Ratte 5 der Placeboserie E nach 1 h
hämorrhagischem Schock und anschließender 2 h Per-
fusion

- a) auffallend weite Sinusoide, rechts deutliche Vakuoli-
sierung der Zellen x 300
- b) helle und dunkle Zellen regellos verteilt, unterschied-
lich große Vakuolen x 512
- c) Ausschnitt aus einer geschädigten Leberzelle:
auffällig heller Zellkern (N), Kernmembran rupturiert (+),
abgerundete Mitochondrien (M) mit Verlust der Cristae, ver-
einzelte Ergastoplasmaschläuche (E), Sinusoid (S), Ery-
throzyt (Ery) x 15000

Abb. 8) Leber der Ratte 4 der Actihaemylserie F nach 1 h
hämorrhagischem Schock und anschließender 2 h Per-
fusion

- a) beginnende Zelldissoziation, erweiterte Sinusoide,
rechts unten ausgeprägte Vakuolisierung der Zellen x 300
- b) links und oben dunkle, rechts helle Zellen mit
zahlreichen Vakuolen, Sinusoide erweitert x 512
- c) Ausschnitt aus zwei benachbarten Leberzellen:
Links: Mitochondrien (M) mit gut erhaltenen Cristae,
rauhes endoplasmatisches Reticulum (E), Zellkern (N),
mikrobodies (mb), Glykogenrosetten (G), Zellmembran (ZM)

Rechts: geschwollene Mitochondrien (M) mit aufgehellter
Matrix, Verlust der Cristae, Vesikulation des glatten (e)
und rauhen endoplasmatischen Reticulums (E) x 15000

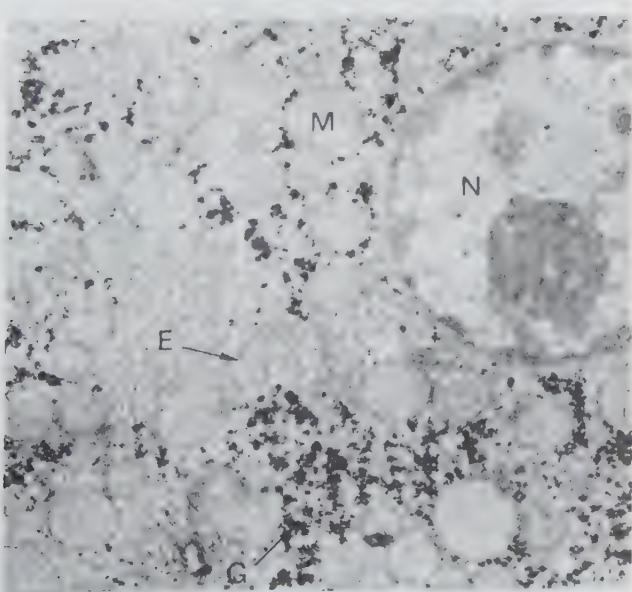
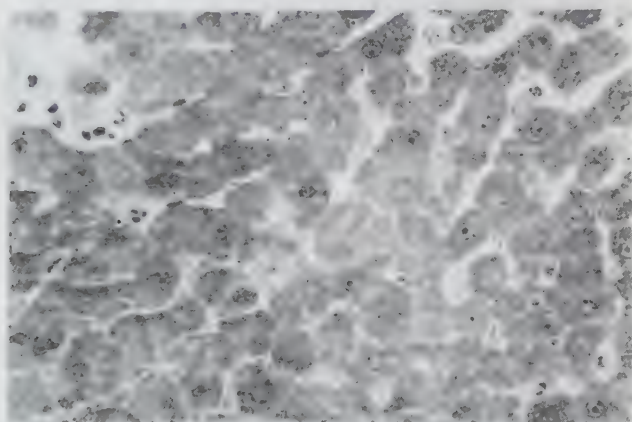
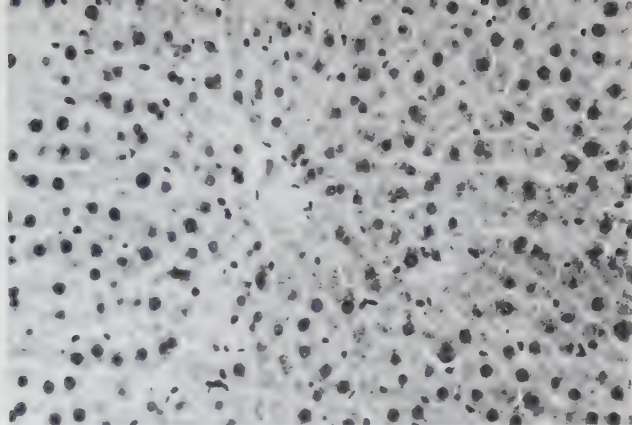
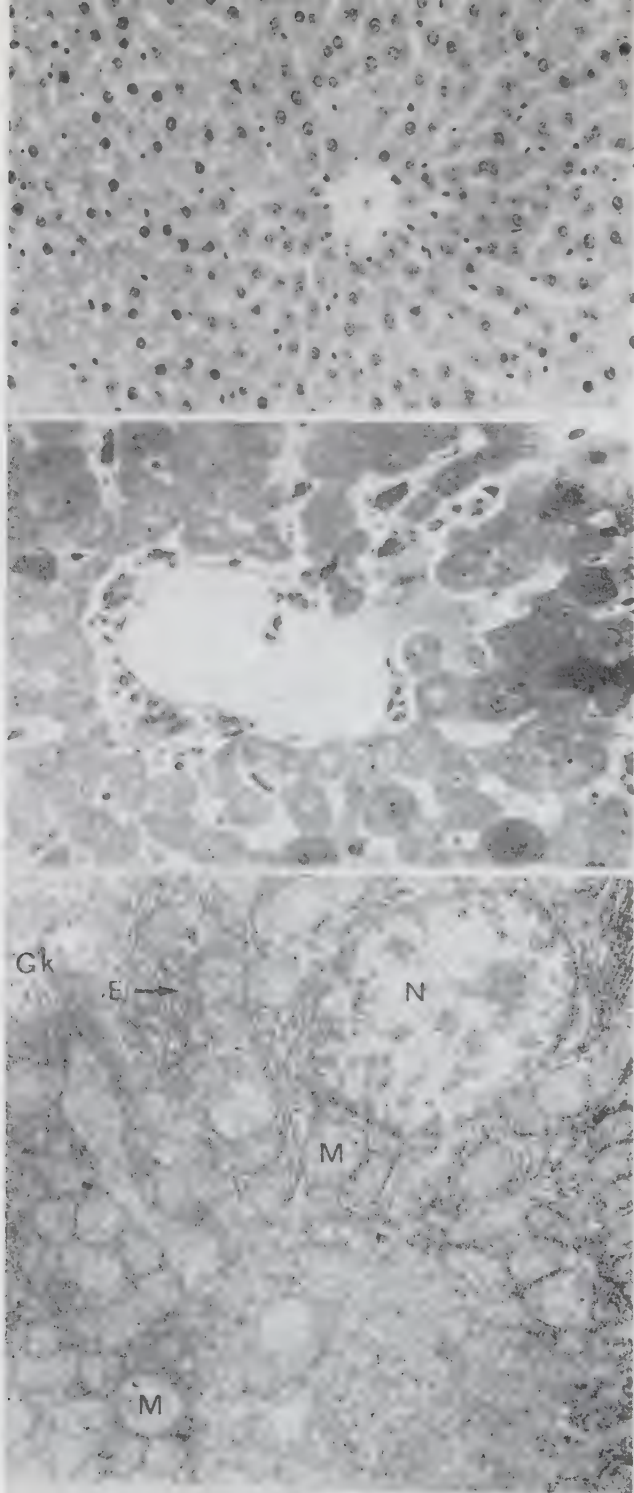
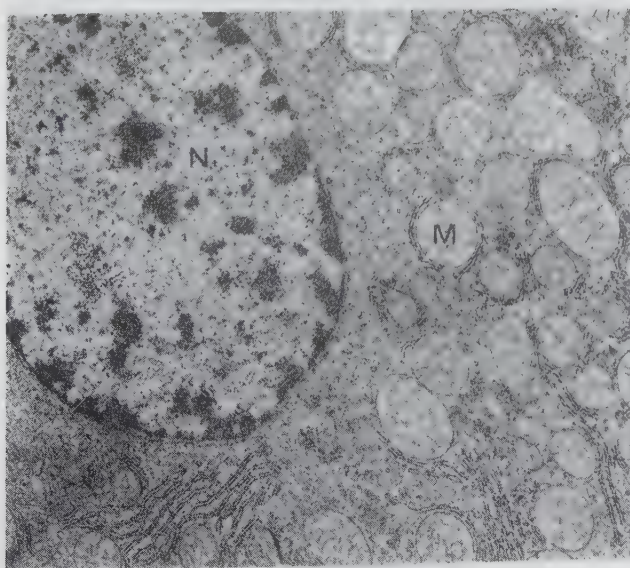
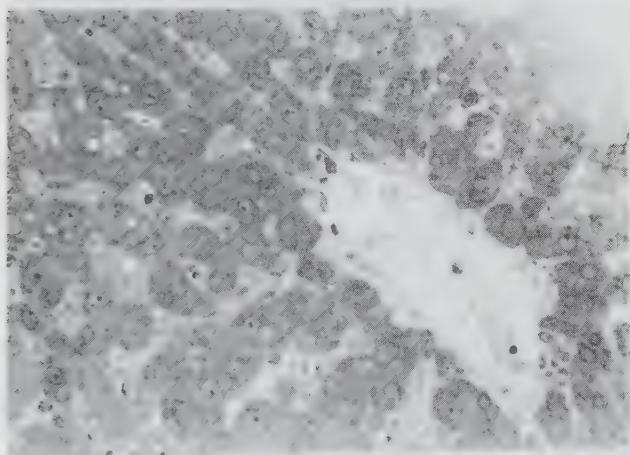
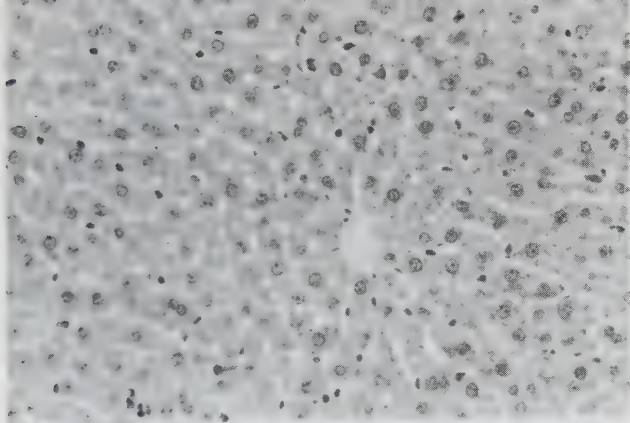


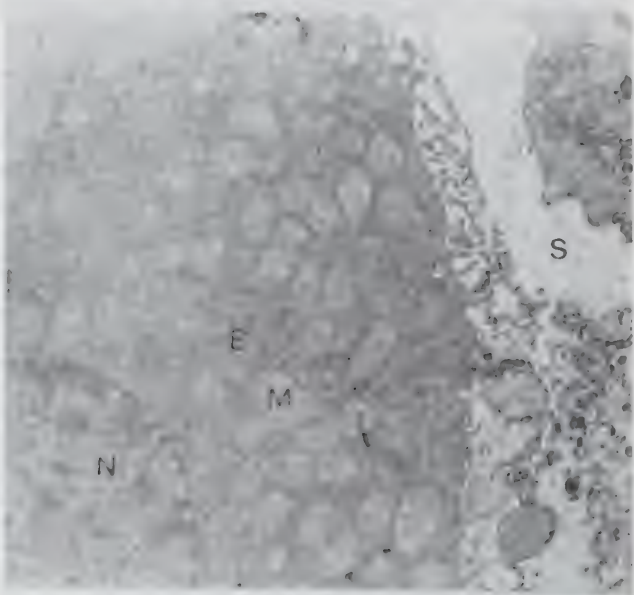
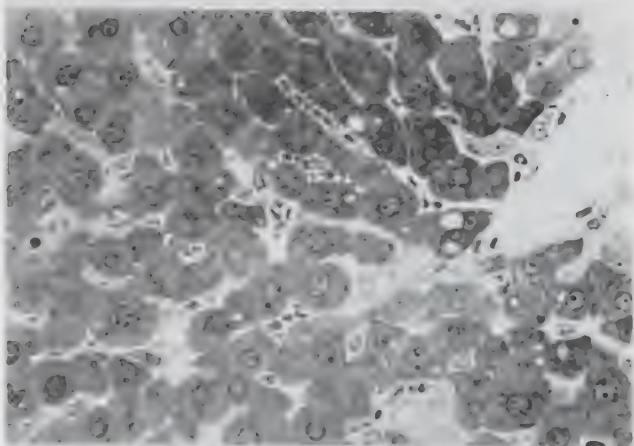
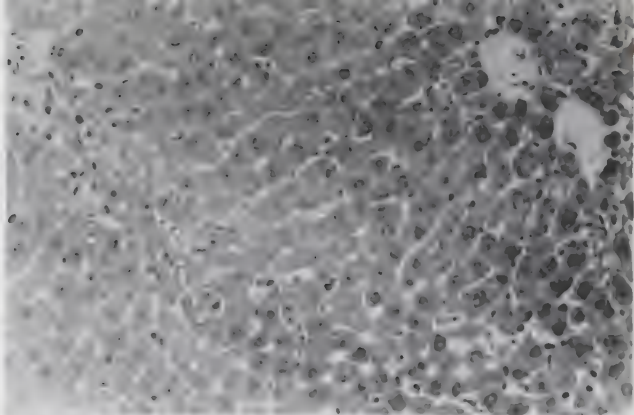
Abb. 1



A b b . 2



A b b. 3



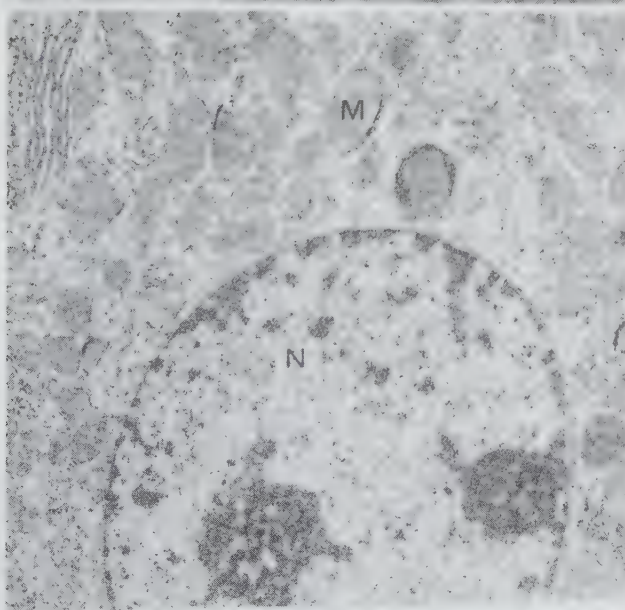
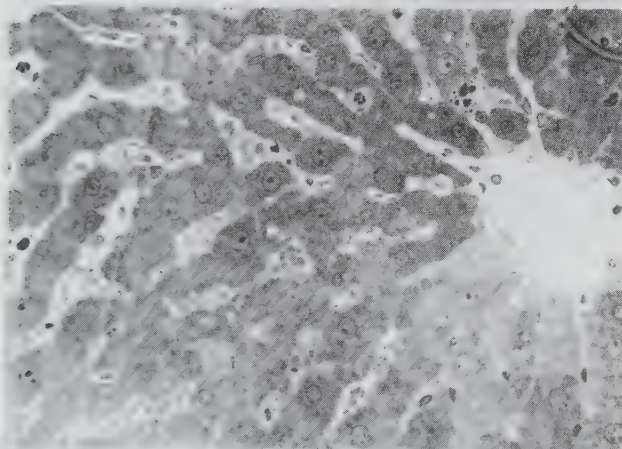
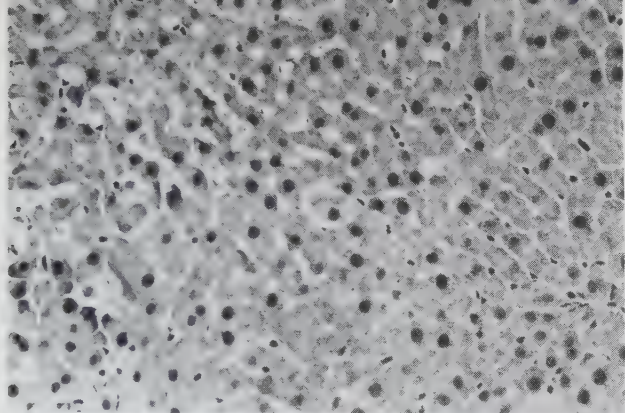


Abb. 5

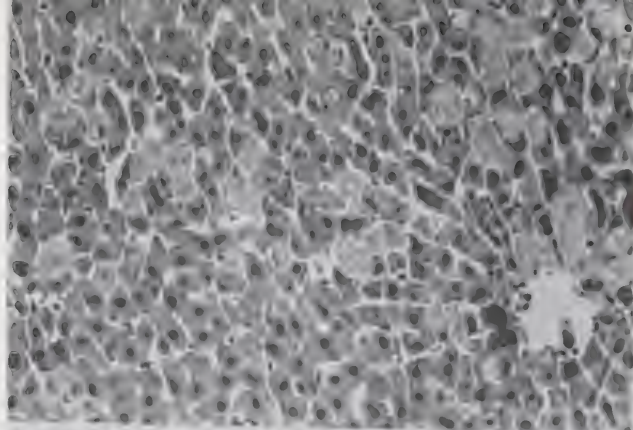


Abb. 6

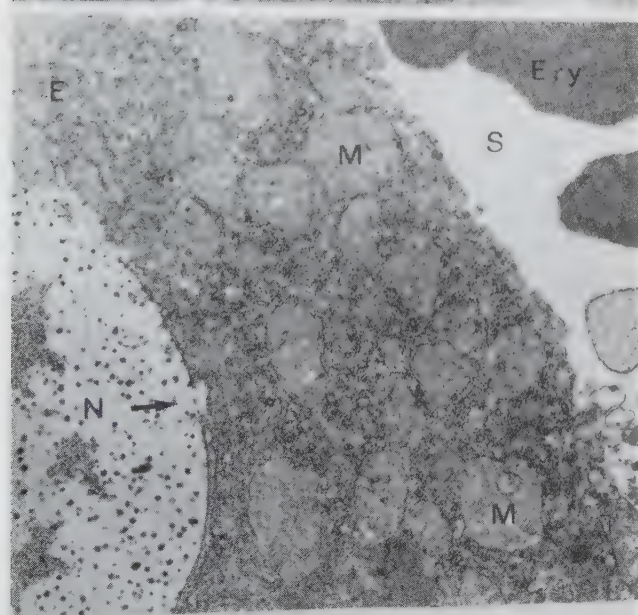
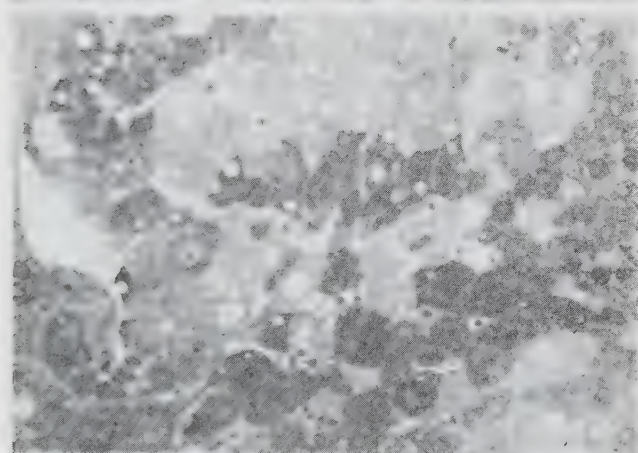
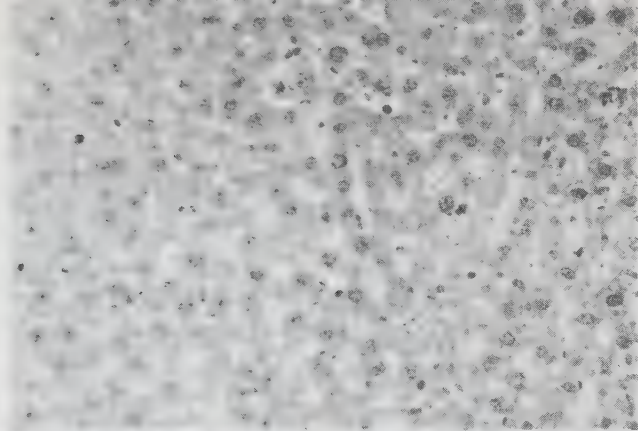
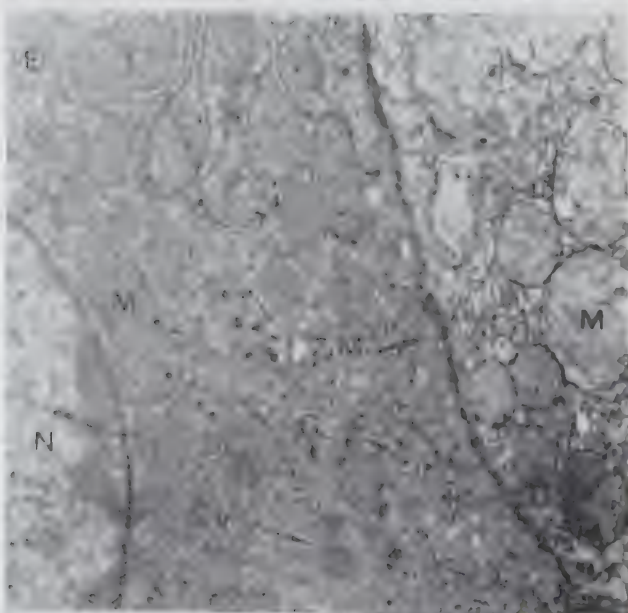
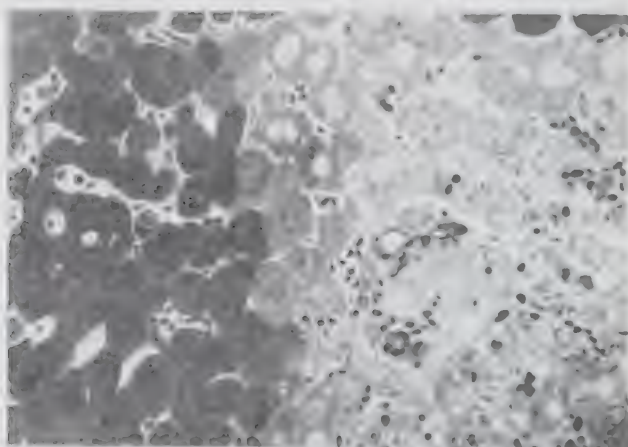
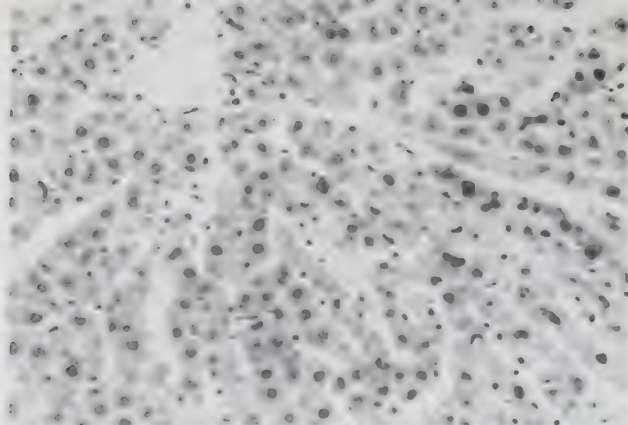


Abb. 7



Herrn Prof. Dr. med. B. Hölscher danken wir für die Überlassung des Themas, die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und die Durchsicht des Manuskriptes. Unser Dank gilt auch der Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft. Ebenfalls zu Dank verpflichtet sind wir Frau M. del Carmen Lazaro-Lacalle (Institut für Neuro-pathologie - Direktor: Prof. J. Cervos-Navarro).

Lebenslauf

Am 17. 10. 1948 wurde ich, Claudia Klein, geb. Classe, als einziges Kind des Richters Georg Classe und seiner Ehefrau Else, geb. Kerp, in Berlin geboren.

Im April 1955 wurde ich in die staatlich anerkannte Privatschule, Grundschule und Oberschule wissenschaftlichen neusprachlichen Zweiges, St. Ursula, eingeschult. Dort bestand ich im Februar 1969 das Abitur.

Im Sommersemester 1969 begann ich das Medizinstudium an der Freien Universität Berlin. Am 29. 1. 1975 legte ich in Berlin das medizinische Staatsexamen ab.

Am 27. 8. 1976 heiratete ich Herrn Walter Klein aus Papenburg / Ems.

Lebenslauf

Am 25. 6. 1948 wurde ich, Walter Klein, als fünftes von sieben Kindern des Arztes Dr. med. Heino Klein und seiner Ehefrau Margareta, geb. Fuchs, in Papenburg / Ems geboren.

Ostern 1955 wurde ich in die Kirchsule in Papenburg eingeschult. Von Ostern 1959 bis zum Abitur am 1. Juli 1967 besuchte ich das neusprachliche Gymnasium in Papenburg.

Nach dem Grundwehrdienst nahm ich zum Sommersemester 1969 in Berlin das Medizinstudium auf; am 29. 1. 1975 bestand ich in Berlin das medizinische Staatsexamen.

Am 27. 8. 1976 heiratete ich Frl. Claudia Classe aus Berlin.

DISSERTATIONS-DRUCK

HÖPFNER GMBH

Pestalozzistr. 106

1 Berlin 12



312 88 85

313 81 98

